

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-188705

(43) 公開日 平成9年(1997)7月22日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/00			C 0 8 B 37/00	J
37/08			37/08	Z

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願平8-288500	(71) 出願人	000195524 生化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
(22) 出願日	平成8年(1996)10月30日	(72) 発明者	宮本 建司 東京都立川市砂川町6-10-23 メゾンブ ロスベリテ201
(31) 優先権主張番号	特願平7-311642	(72) 発明者	小山田 秀和 埼玉県上尾市弁財1-4-24
(32) 優先日	平7(1995)11月7日	(74) 代理人	弁理士 萩野 平 (外3名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 グリコサミノグリカン誘導体およびその製造法

(57) 【要約】

【課題】 G A G を温和な条件下、短時間に化学修飾を施す方法および該方法で製造しうる G A G 誘導体を提供すること。

【解決手段】 ①カルボン酸とハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイル(Rpt-X) とを反応させて得られる混合酸無水物と、水酸基またはアミノ基を有するグリコサミノグリカン(GAG) とを反応させ、該混合酸無水物のカルボニル基と該GAG の水酸基もしくはアミノ基とをエステル結合またはアミド結合させてなるGAG誘導体の製造法、②カルボキシ基を有するGAG とRpt-X とを反応させるGAG 混合酸無水物の製造法、③前記②の混合酸無水物と、1級アミンまたは2級アミンとを反応させ、アミド結合してなるGAG 誘導体の製造法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 カルボン酸とハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイルとを反応させて得られる混合酸無水物と、水酸基またはアミノ基を有するグリコサミノグリカンとを反応させ、該混合酸無水物のカルボニル基と該グリコサミノグリカンの水酸基もしくはアミノ基とをエステル結合またはアミド結合させることを特徴とする、カルボン酸と該グリコサミノグリカンとがエステル結合またはアミド結合してなるグリコサミノグリカン誘導体の製造法。

【請求項2】 カルボン酸が、カルボキシル基以外の官能基が保護基で保護されたものであり、上記エステル結合反応またはアミド結合反応後、該保護基を除去する請求項1記載のグリコサミノグリカン誘導体の製造法。

【請求項3】 カルボキシル基を有するグリコサミノグリカンとハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイルとを反応させて、該グリコサミノグリカンとハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイルとからなるグリコサミノグリカン混合酸無水物を製造することを特徴とするグリコサミノグリカン誘導体の製造法。

【請求項4】 カルボキシル基を有するグリコサミノグリカンとハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイルとを反応させて得られるグリコサミノグリカン混合酸無水物と、1級アミンまたは2級アミンとを反応させ、該混合酸無水物のカルボニル基と該アミンのアミノ基とをアミド結合させることを特徴とする、該グリコサミノグリカンと1級アミンまたは2級アミンとがアミド結合してなるグリコサミノグリカン誘導体の製造法。

【請求項5】 無水の有機溶媒中で中和剤の存在下で反応させることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の製造法。

【請求項6】 水混和性有機溶媒を含んだ水溶液中で反応させることを特徴とする請求項1または4記載の製造法。

【請求項7】 上記グリコサミノグリカンがコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸またはこれらのカルボキシル基にスパーサー化合物としてジアミンを共有結合させたアミノ基を有するスパーサー化合物結合グリコサミノグリカンであり、カルボン酸がインドメタシン、デオキシコール酸、アセチルサリチル酸、サラゾスルファピリジン、メトトレキサート、ロイシンエンケファリン、ロイシン、セリン、グリシンまたはグルタミンである請求項1記載の方法で製造されたカルボン酸と水酸基またはアミノ基を有するグリコサミノグリカンとがエステル結合またはアミド結合してなるグリコサミノグリカン誘導体。

【請求項8】 上記グリコサミノグリカンがコンドロイチン硫酸またはヒアルロン酸であり、1級アミンまたは2級アミンがベスタチン、トラネキサム酸、アドリアマイシン、メトトレキサート、フェニアラニンまたはグ

ルタミンである請求項4記載の方法で製造されたカルボキシル基を有するグリコサミノグリカンと1級アミンまたは2級アミンとがアミド結合してなるグリコサミノグリカン誘導体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、グリコサミノグリカン誘導体およびその製造法に関する。

## 【0002】

10 【従来の技術】 グリコサミノグリカン（以下、「GAG」ということがある）には抗血栓剤であるヘパリンや関節炎の治療剤であるヒアルロン酸のように、すでにその有用性が明らかなものと、コンドロイチン硫酸などのように用途開発が十分なされていないものがある。一方、ペプチドやタンパク質等は様々な優れた薬理作用を示すため有用な医薬品となる可能性を秘めた化合物群であるが、生体内での不安定さのため実用化が困難である場合が多い。そこでこれらの化合物を高分子化合物で修飾することで生体内での安定性を高めることが知られており、生体適合性に優れたGAGとアミノ酸、ペプチド、タンパク質、脂質、その他の低分子有機化合物等との複合体（多糖ハイブリット）はそのような目的に適したものであると考えられ、両者の有用性を増したり、新たな機能を持たせることが出来る。

20 【0003】 例えば、ヒアルロン酸は動物組織中に天然に存在し生体再吸収性を有すると共に毒物学のおび免疫学的作用が存在しないためそれ自体が薬剤、化粧品として利用されており、これに医薬品や生理活性ペプチドを結合させたものは優れたドラッグデリバリーシステムの薬剤となる。またヒアルロン酸を化学修飾により不溶化することで生体適合性にすぐれた医療用材料となる。

30 【0004】 上記の多糖ハイブリットを得るためのGAGの化学修飾法としては、GAGが有機溶媒に不溶であることからGAGをジメチルホルムアミド（DMF）に懸濁させピリジンに触媒とし酸塩化物と反応させる方法（Eur. J. Biochem., 1, 46-50(1967), Chem. Express, 6(9), 647-650(1991)）、およびGAGがカルボキシル基を有し水溶性であるため、水溶液中、N-ヒドロキシコハク酸イミド（HONSu）等の存在下で水溶性カルボジイミド（WSC）のような活性化縮合剤と処理することでGAGとアミン類とを結合させる方法が知られている。

40 【0005】 また、ヘパリンのナトリウム塩をアンモニウム塩または3級アミン塩に置換し、DMFに可溶にした後、ジメチルアミノピリジンに触媒とし、カルボン酸の対称酸無水物と反応させる方法が知られている（Carbohydr. Res., 236, 107-119(1992)）。一方、ペプチドの化学合成法として、塩化ジメチルホスフィノチオイル（Mpt-Cl）を用いる混合酸無水物法によってアミノ酸を縮合する反応が知られている（Chem. Lett., 1, p45-48(1982)）。この方

法は、ペプチド合成においてアミノ酸の水酸基を無保護で反応でき、またアルコール系の溶媒中でも反応することができる方法である。また、酢酸、安息香酸、グリコール酸、グルクロン酸等のカルボン酸とM p t - C l とから誘導される混合酸無水物とグルコサミンまたはガラクトサミン等のアミノ糖とを反応させるN-アシルアミノ糖の製造方法が知られている(特開昭61-197589)。

【0006】しかしながら、グリコサミノグリカンを含む多糖の化学修飾にハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイルを用いた混合酸無水物法は使用されていなかった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従来の、GAGの化学修飾法では、加熱や長時間の反応など過酷な反応条件が必要であり、しばしば低分子化や副反応を伴っていた。また、WSCのような活性化縮合剤を使用する方法は、活性化縮合剤や活性化されたカルボキシル基が水と反応して徐々に分解する上、反応が遅いため過剰の試薬を使用することからアミド化率をコントロールすることが困難であった。また過剰に使用した活性化縮合剤やその分解物、また特にアシル転移により副生するアシル尿素の除去が困難なため、しばしば問題となっていた。

【0008】さらに、ヘパリンのアンモニウム塩または3級アミン塩をカルボン酸の対称酸無水物と反応させる方法は、対称酸無水物が不安定であるので反応中に分解するためカルボン酸を所望量ヘパリンに導入することが困難であるという問題があった。本発明の目的は、GAGを温和な条件下、短時間に化学修飾を施す方法および該方法で製造するGAG誘導体を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究の結果、上記課題を以下の構成によって解決する事に成功した。すなわち本発明は、

1) カルボン酸とハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイルとを反応させて得られる混合酸無水物と、水酸基またはアミノ基を有するグリコサミノグリカンとを反応させ、該混合酸無水物のカルボニル基と該グリコサミノグリカンの水酸基もしくはアミノ基とをエステル結合またはアミド結合させることを特徴とする、カルボン酸と該グリコサミノグリカンとがエステル結合またはアミド結合してなるグリコサミノグリカン誘導体の製造法、

2) カルボン酸が、カルボキシル基以外の官能基が保護基で保護されたものであり、上記エステル結合反応またはアミド結合反応後、該保護基を除去する上記1)記載のグリコサミノグリカン誘導体の製造法、

3) カルボキシル基を有するグリコサミノグリカンとハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイルとを反応させて、該グリコサミノグリカンとハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイルとからなるグリコサミノグリカ

ン混合酸無水物を製造することを特徴とするグリコサミノグリカン誘導体の製造法、

4) カルボキシル基を有するグリコサミノグリカンとハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイルとを反応させて得られるグリコサミノグリカン混合酸無水物と、1級アミンまたは2級アミンとを反応させ、該混合酸無水物のカルボニル基と該アミンのアミノ基とをアミド結合させることを特徴とする、該グリコサミノグリカンと1級アミンまたは2級アミンとがアミド結合してなるグリコサミノグリカン誘導体の製造法、

5) 無水の有機溶媒中で中和剤の存在下で反応させることを特徴とする上記1)～4)のいずれかに記載の製造法、

6) 水混和性有機溶媒を含んだ水溶液中で反応させることを特徴とする上記1)または4)記載の製造法、

7-1) 上記グリコサミノグリカンがコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸またはこれらに水酸基もしくはアミノ基を有するスパーサー化合物が結合されたスパーサー化合物結合グリコサミノグリカンであり、カルボン酸が1または2以上のカルボキシル基を有する生理活性物質である、上記1)記載の方法で製造されたカルボン酸と水酸基またはアミノ基を有するグリコサミノグリカンとがエステル結合またはアミド結合してなるグリコサミノグリカン誘導体、

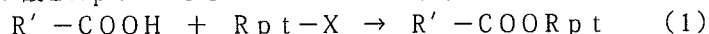
7-2) 上記グリコサミノグリカンがコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸またはこれらのカルボキシル基にスパーサー化合物としてジアミンを共有結合させたアミノ基を有するスパーサー化合物結合グリコサミノグリカンであり、カルボン酸がインドメタシン、デオキシコール酸、アセチルサリチル酸、サラゾスルファピリジン、メトトレキサート、ロイシンエンケファリン、ロイシン、セリン、グリシンまたはグルタミンである1)の方法で製造されたカルボン酸と水酸基またはアミノ基を有するグリコサミノグリカンとがエステル結合またはアミド結合してなるグリコサミノグリカン誘導体、

8-1) 上記グリコサミノグリカンがコンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸またはこれらにカルボキシル基を有するスパーサー化合物が結合されたスパーサー化合物結合グリコサミノグリカンであり、1級アミンまたは2級アミンが1級アミノ基または2級アミノ基を有する生理活性物質である上記4)記載の方法で製造されたカルボキシル基を有するグリコサミノグリカンと1級アミンまたは2級アミンとがアミド結合してなるグリコサミノグリカン誘導体、

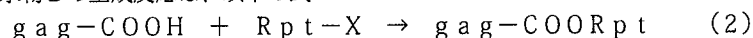
8-2) 上記グリコサミノグリカンがコンドロイチン硫酸またはヒアルロン酸であり、1級アミンまたは2級アミンがベスタチン、トラネキサム酸、アドリアマイシン、メトトレキサート、フェニアラニンまたはグルタミンである上記4)記載の方法で製造されたカルボキシル基を有するグリコサミノグリカンと1級アミンまたは

2級アミンとがアミド結合してなるグリコサミノグリカン誘導体である。

【0010】以下、本発明につき、詳細に説明する。本発明で使用する、カルボン酸とハロゲン化ジ低級アルキルホスフィノチオイル（以下、Rpt-Xと記す。Xはハロゲン、Rptはジ低級アルキルホスフィノチオイル基：一般式 $R_2P=S$ （式中、Rは炭素数1～4のアルキル基、好ましくはメチル基）を示す。）とを反応させて得られる混合酸無水物（以下、「混合酸無水物A」ともいう）は、該カルボン酸とRpt-Xとを $-25^{\circ}\text{C}$ か $\times 10$



（R'はカルボン酸のひとつのカルボキシル基を除く残基である。）混合酸無水物Bの生成反応は、以下の式 ※



（gagはGAGのひとつのカルボキシル基を除く残基である。）

本発明において、GAGとは、GAG自体およびGAG自体にスペーサー化合物等を導入した誘導体を含む概念である。

【0012】上記（2）式の混合酸無水物B、即ち、 $\text{gag} - \text{COORpt}$ は、本発明の方法で生成されるGAG誘導体の一種であり、かつ更にこれと1級アミンまたは2級アミンと反応して得られる新規GAG誘導体の原料でもある。

【0013】上記式（1）の反応に使用されるカルボン酸は、Rpt-Xと反応しうるカルボキシル基を有する化合物を全て包含し、該化合物のカルボキシル基以外の官能基（例えば、アミノ基、水酸基等）が保護基で保護された化合物であってもよい。カルボン酸としては、具体的にはアミノ基を保護したアミノ酸（Fmoc-Gln-OH、Fmoc-Leu-OH、Z-Leu-OH、Boc-Leu-OH、Fmoc-Pro-OH、Boc-Gly-OH、Z-Gly-OH、Fmoc-Ser(O<sup>t</sup>Bu)-OH、等、ここでFmoc-は9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基、Z-はベンジルオキシカルボニル基、Boc-は第3ブトキシカルボニル基、<sup>t</sup>Buは第3ブチル基をそれぞれ示す。）、アミノ基を上記アミノ酸の場合と同様に保護したペプチド、分子内にカルボキシル基を持ち有用な薬理作用を有する生理活性物質（例えば、インドメタシン、デオキシコール酸、アセチルサリチル酸、サラゾスルファピリジン、ニコチン酸、チオクト酸、インドール-3-酢酸、レチノイン酸、メトトレキサート等）、スペーサー化合物としてジカルボン酸を公知の方法でアミノ基あるいは水酸基を有する化合物に結合させカルボキシル基を持たせた該化合物、脂肪酸カルボン酸（パルミチン酸、リノール酸、リノレン酸等）、ケイ皮酸、サリチル酸、trans-エポキシコハク酸等が挙げられる。

【0014】また、上記式（2）の反応に使用されるカルボキシル基を有するGAGとしては、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸等が挙げられる。特にヒア

\*ら $40^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $0^{\circ}\text{C}$ から $25^{\circ}\text{C}$ で1分から1時間、好ましくは1分から10分間反応させることにより得られる。また、カルボキシル基を有するグリコサミノグリカンとRpt-Xとを反応させて得られるグリコサミノグリカン混合酸無水物（以下、「混合酸無水物B」ともいう）は、カルボキシル基を有する該GAGとRpt-Xとを上記混合酸無水物Aの調製条件と同じ条件下で反応させることにより得られる。

【0011】混合酸無水物Aの生成反応は、以下の式

（1）で表される。

※（2）で表される。

ルロン酸およびコンドロイチン硫酸は、生体適合性、GAG誘導体の活性持続性等の点で優れるので好ましい。上記のGAGは、由来、分子量には限定されないが、一般的には分子量約1万～500万、好ましくは約2万～200万が挙げられる。また遊離型または塩型のGAGのいずれも使用できるが、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、アミン（例えば、トリエチルアミン、N-メチルモルホリン、ジイソプロピルエチルアミン等の3級アミン等）塩等のアルカリ塩が好ましく、特に一般的には入手し易いナトリウム塩またはカリウム塩が好ましい。

【0015】上記カルボキシル基を有するGAGとしては、少なくともカルボキシル基を有するように、例えばカルボキシル基を有するスペーサー化合物等の公知化合物を公知の手法により結合することにより合成することもできる。合成に使用するスペーサー化合物としては、ジカルボン酸、アミノ酸あるいはこれらのカルボキシル基に保護基を導入した誘導体等が挙げられる。

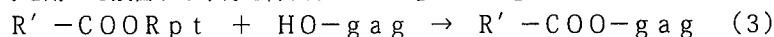
【0016】スペーサー化合物としては、例えば、 $R^1 - (\text{CH}_2)_n - R^2$ （ $R^1 = R^2 =$ カルボキシル基、または $R^1 =$ 保護されたカルボキシル基かつ $R^2 =$ アミノ基、 $n$ が2～18）が挙げられるが、これに制限されるものではない。ここで、保護基は、スペーサー化合物を結合したGAG作成後にカルボキシル基の保護基を脱保護できるものであればよい。

【0017】尚、本発明においては、便宜上「カルボキシル基を有するGAG」は「カルボン酸」には包含されないものと定義する。Rpt-Xは、公知のものを使用できるが、好ましくは塩化物、臭化物等を用い、低級アルキル基としては炭素数1～4のアルキル基、好ましくはメチル基のものを用いる。具体的には塩化ジメチルホスフィノチオイル（Mpt-Cl）が例示される。

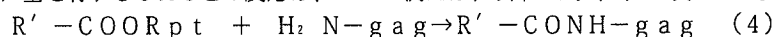
【0018】混合酸無水物AまたはBの生成反応の際、カルボキシル基がフリーの酸である場合には混合酸無水物AまたはBの形成（カルボキシル基の活性化）に伴い発生する塩酸を中和するための塩基、好ましくはトリエ

チルアミン、N-メチルモルホリン、ジイソプロピルエチルアミン等の3級アミンをRpt-Xと等モル量添加することが好ましい。またカルボキシル基が該塩基の塩である場合にはさらに塩基を添加する必要はない。

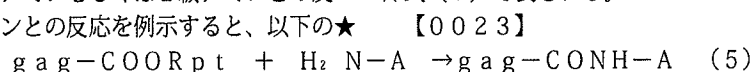
【0019】上記生成反応は、ジメチルホルムアミド(DMF)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、テトラヒドロフラン(THF)、クロロホルム、ジクロロメタン等の単一または混合された有機溶媒中、好ましくは無水の有機溶媒中で行われる。例えば、カルボン酸をRpt-Xと反応させて(活性化して)混合酸無水物Aを製造する場合は、クロロホルムやDMF等の非プロトン性有機溶媒中で反応させる。またカルボキシル基を有するGAGのカルボキシル基を同様に活性化して混合酸無水物Bを製造する場合には、公知の方法によりGAGのカルボキシル基や硫酸基のアルカリ金属塩(ナトリウム塩、カリウム塩等)またはアルカリ土類金属塩等をアンモニウム塩または3級アミン塩に置換することでDMF等の非プロトン性有機溶媒に可溶化したものを使用して反応させることができる。この場合、GAGを有機溶媒に溶解後モレキュラーシーブ等を用いて残留する水分を除去す\*



混合酸無水物Aとアミノ基を有するGAGとの反応は、※ ※例えば、以下の式(4)で表される。



混合酸無水物Bと1級アミンもしくは2級アミンとの反応は、例えば1級アミンとの反応を例示すると、以下の★



(Aはアミンから1個のアミノ基を除いた残基を表す。)

前記式(3)の反応によって、カルボン酸を、水酸基を有するGAGに導入する場合、該GAGの水酸基に混合酸無水物Aを反応させ、エステル結合を形成させることにより導入することができる。この際、反応に使用される溶媒は水混和性有機溶媒を含んだ水溶液及び無水の有機溶媒が挙げられるが、反応効率の良さを考慮すると無水の有機溶媒であることが好ましい。

【0024】水混和性有機溶媒としては、具体的にはジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、N,N-ジメチルアセトアミド(DMA)、アセトアミド、DMF、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサメチルリン酸トリアミド(HMPA)、N-メチルピロリドン、ピリジン等が挙げられる。前記水溶液としては、前記例示した水混和性有機溶媒のいずれかから選択される1種以上の総計で約0~50%の範囲を含む水溶液が挙げられる。

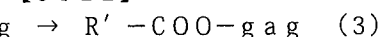
【0025】無水の有機溶媒としては、具体的には前記例示した水混和性有機溶媒およびクロロホルム、ジクロロメタン等の単一または混合された溶媒が挙げられる。水酸基を有するGAGとしては、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸、ヘパ

\*ると、混合酸無水物の分解が抑えられるので、この操作を行わない場合に比べて後述の1級アミンまたは2級アミンの導入率が向上する。

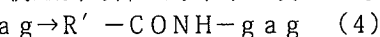
【0020】カルボン酸またはカルボキシル基を有するGAGに対して、Rpt-Xは過剰に用いることも可能であるが、通常1.0~1.2当量、好ましくは等モル(1.0当量)を使用すれば、所望の混合酸無水物を得ることが出来る。酸無水物法には対称酸無水物法と混合酸無水物法が知られており、所望の酸無水物を得るために前記対称酸無水物法を用いると、2当量以上のカルボン酸が必要であるのに対し、本発明の混合酸無水物法においては等モル程度のカルボン酸、カルボキシル基を有するGAGでよい。

【0021】このようにして得られる混合酸無水物は、単離することも可能であるが、そのまま混合酸無水物Aは水酸基もしくはアミノ基を有するGAGと、混合酸無水物Bは、1級アミンもしくは2級アミンと反応させることによりグリコサミノグリカン誘導体を生成することもできる。混合酸無水物Aと水酸基を含有するGAGとの反応は、例えば以下の式(3)で表される。

【0022】



※ ※例えば、以下の式(4)で表される。



★式(5)で表される。

【0023】



リン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸等のGAGおよびその誘導体等が挙げられる。また、これらのGAGに水酸基を有するスパーサー化合物を結合した化合物であってもよい。

【0026】具体的方法としては、混合酸無水物Aを、GAG(遊離型)、GAGのナトリウム塩もしくはカリウム塩等、またはGAGのナトリウム塩もしくはカリウム塩等をアンモニウム塩もしくは3級アミン塩に置換したGAGと-25℃から60℃、好ましくは0℃から25℃で5分から24時間反応させる。この際、N,N-ジアルキルアミノピリジン系触媒、特に4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)あるいは4-ピロリジノピリジン等のエステル化反応の触媒を添加することが好ましく、この触媒添加によりさらに温和な条件での反応が可能となる。

【0027】また、反応によって生成する酸を中和する目的で酸の中和剤として、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、N-メチルモルホリン等の3級アミンまたは炭酸水素ナトリウムのような無機塩基を添加することが好ましい。前記式(4)の反応によって混合酸無水物Aとアミノ基を有するGAGとを、または前記式(5)の反応によって混合酸無水物Bと1級アミンもしくは2級アミン(以下、「アミノ基を有す

るGAG、1級アミンもしくは2級アミン」をまとめてアミノ成分ということがある)とを反応させる場合は、-25℃から60℃、好ましくは0℃から25℃で、5分間から24時間、好ましくは30分間から2時間、上記無水の有機溶媒中または水混和性有機溶媒を含んだ水溶液中で反応させることができる。この際、反応の進行と共に生成する酸(ジ低級アルキルチオホスフィン酸)を中和する目的で、酸の中和剤として上記中和剤を添加することが好ましい。該水溶液の含水率としては、0~80容量%が挙げられる。

【0028】本発明に用いられるアミノ基を有するGAGとしては、前記の水酸基を有するGAGとして例示したGAGのアミノ糖の置換アミノ基(アセチルアミノ基、スルホアミノ基等)をアミノ基に変換した化合物、例えば、脱アセチル誘導体等が挙げられる。また、GAGの水酸基あるいはカルボキシル基にアミノ基を有するスパーサー化合物、例えば、ジアミン、アミノ酸等を共有結合させて、アミノ基を有するスパーサー化合物結合GAGとすること、あるいはGAGの還元末端にアミノ基を有するスパーサー化合物を導入してスパーサー化合物結合GAGとすることによってもアミノ基を有するGAGとすることができる。GAGの還元末端にアミノ基を有するスパーサー化合物を結合したGAGを使用すると、GAGの還元末端、すなわち特定の一カ所に、カルボン酸を結合させることが可能となる。

【0029】スパーサー化合物の導入法としては、例えばスパーサー化合物としてのアミノ基を保護したアミノ酸等のカルボキシル基とGAGの水酸基とをエステル結合させた後、脱保護する方法、ジアミンの一方のアミノ基とGAGのカルボキシル基とをアミド結合させる方法、およびGAGの還元末端とジアミンとを適当な溶媒中で混合してシッフ塩基として結合させ、好ましくはさらに還元剤で処理することでGAGとジアミンとを還元アミノ化により結合させる方法等が挙げられる。

【0030】スパーサー化合物としてのアミノ基を保護したアミノ酸としては、グリシンやロイシン等の任意の天然のアミノ酸を用いることが出来る。また、6-アミノカプロン酸のような任意の炭素数の $\omega$ -アミノ酸等を用いることもでき、この場合スパーサーとしての自由度を増すことができる。アミノ基の保護基としては例えば、接触還元で除去可能なベンジルオキシカルボニル(Z)基、塩基で除去可能な9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基、トリフルオロ酢酸水溶液で除去される第3ブトキシカルボニル(Boc)基等が好ましい。

【0031】スパーサー化合物としてジアミンを用いる場合は、 $H_2N-(CH_2)_n-NH_2$  ( $n$ は好ましくは2~18)等で示されるジアミン(例えば、1,6-ヘキサレンジアミン等)やアミノ酸でもあるリジン及びそのエステル体などが使用できる。また、アミノ基を保護

したアミノアルコールをスパーサー化合物として用いてGAGのカルボキシル基とエステル結合させて次いで脱保護することによりアミノ基を有するスパーサー化合物結合GAGとしてもよい。

【0032】スパーサー化合物の導入法としてはカルボジイミド類を使用してGAGのカルボキシル基にアミド結合もしくはエステル結合する等の公知法が操作の簡便さやコスト的に優れている。また、上記のGAGのカルボキシル基をR<sub>p</sub>t-Xで活性化させて混合酸無水物Bとし、これを前記式(5)の反応によってジアミンと反応させてもよい。

【0033】GAGのカルボキシル基を混合酸無水物Bとして活性化し、1級アミンまたは2級アミンと反応させる場合に使用する1級アミンまたは2級アミンとしては、例えばアミノ酸(グルタミン、フェニルアラニン等)、アミノ酸エステル(フェニルアラニンベンジルエステル等)、ペプチド、ペプチドエステル、ペプチドアミド、タンパク質、分子内にアミノ基を持ち有用な薬理作用を有する生理活性物質(トラネキサム酸、サイクロセリン、ベスタチン、アミノセファロsporin酸、ピリドキサミン、アドリアマイシン、メトトレキサート等)、アミノ酸またはジアミンをスパーサー化合物として結合させアミノ基を持たせた化合物、アミノ糖(グルコサミン、ガラクトサミン等)、アミノ基を有する脂質(ホスファチジルエタノールアミン等)等が挙げられる。

【0034】上記混合酸無水物Aと水酸基またはアミノ基を有するGAGとの反応、または混合酸無水物Bと1級アミンもしくは2級アミンとの反応の後、エタノール沈澱や透析等などの公知の方法で精製することが可能である。また、反応後に生成物が析出する場合は、ガラスフィルター等により濾集し、重曹水、水、及びエタノール等の適当な溶媒で順次洗浄するといったより簡便な精製操作で目的物を得ることが出来る。

【0035】前記式(3)~(5)の反応において、水酸基を有するGAGまたはアミノ成分に対する混合酸無水物および触媒の量は、所望のGAG誘導体の種類、すなわち、GAGの種類、分子量あるいは混合酸無水物の種類ならびにGAGに対するカルボン酸または1級アミンもしくは2級アミンの所望導入数等により適宜選定され得るが、一般的にアミノ成分とアミド結合を形成させる場合には所望導入数の1.0~3.0倍モルの混合酸無水物を用いればよく、GAGの水酸基とエステル結合を形成させる場合には所望導入数の2.0~10倍モルの混合酸無水物を用いればよい。なお、GAG誘導体へのカルボン酸または1級アミンもしくは2級アミンの導入率は、GAG構成二糖単位当たりの導入モル数の百分率として定義できる。導入モル数は、プロトンNMRの積分強度の測定により決定できる。

【0036】さらに、本発明の製造法によれば、カルボ

10

20

30

40

50

ン酸としてアミノ基を保護したアミノ酸を選択し、混合酸無水物Aとして前記式(4)の方法で反応させることで、アミノ基を有するGAGのアミノ基に本発明の方法によってアミノ基を保護したアミノ酸のカルボキシル基を結合後、このアミノ保護基を除去し、再びN-保護アミノ酸を本発明の方法で結合する操作を繰り返すことにより、GAG上で順次アミノ酸を伸長させるペプチド合成を行いGAG-ペプチド結合体を合成することも可能である。この場合、アミノ基の保護基としては例えば、10%ジエチルアミン水溶液等で速やかに除去できる9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基等が好ましい。

#### 【0037】

【実施例】以下実施例により本発明を詳細に説明する。

#### 調製例1

コンドロイチン硫酸へのスパーサーとしての1, 6-ヘキサンジアミンの導入

平均分子量3万のコンドロイチン硫酸ナトリウム(10g)を水(100ml)に溶解しDMF(100ml)を加えた。N-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)(40ミリモル)のDMF溶液(30ml)と1, 6-ヘキサンジアミン・2塩酸塩(20ミリモル)を加えた後、室温でジクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(20ミリモル)のDMF溶液(40ml)を加えた。室温下にて1晩攪拌後、析出したジクロヘキシル尿素をエタノールによりガラスフィルター上で洗浄除去した。エタノール洗浄後、ガラスフィルター上に得られた沈澱をさらに3回エタノール沈澱法により精製した後、減圧乾燥したところ1, 6-ヘキサンジアミンが導入されたコンドロイチン硫酸を白色粉末として7.67g得た。270MHzのプロトンNMRの測定の結果、コンドロイチン硫酸のアセチル基由来のシグナルと( $\delta=2$  ppm)とスパーサーの4つのメチレン基由来のシグナル( $\delta=1.3-1.7$  ppm)の強度比(3:2.60)よりコンドロイチン硫酸の構成2糖単位あたりの上記ジアミンの導入率は32%であった。

【0038】ここで、導入率は以下の式で表される。  
導入率(%) = 2糖単位当たりのジアミンの導入モル数  $\times 100$

#### 調製例2

コンドロイチン硫酸へのスパーサーとしてのリジンメチルエステルの導入

平均分子量3万のコンドロイチン硫酸ナトリウム(3g)を水(30ml)に溶解しDMF(30ml)を加えた。リジン(Z)メチルエステル塩酸塩(3ミリモル)とHOBt(6ミリモル)を加えた後、氷冷下にてDCC(6ミリモル)のDMF溶液(10ml)を加えた。室温で1晩攪拌後、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回エタノール沈澱法により精製後、水(10m

1)に溶解し脱イオン水にて3日間透析した。0.22ミクロンのフィルターで濾過後、凍結乾燥したところ標記化合物を白色粉末として3.08g得た。270MHzのプロトンNMRの測定の結果、コンドロイチン硫酸のアセチル基由来のシグナルと( $\delta=2$  ppm)とZ基のベンゼン環由来のシグナル( $\delta=7.3-7.5$  ppm)の強度比(3:1.23)よりコンドロイチン硫酸の2糖単位あたりのリジン(Z)メチルエステルの導入率は25%であった。このものを水溶液中で蟻酸アンモニウムと10%パラジウム炭素による接触還元に付してZ基を除去したところリジンメチルエステル結合コンドロイチン硫酸を得た。

#### 【0039】実施例1

デオキシコール酸修飾コンドロイチン硫酸の合成

デオキシコール酸(0.1ミリモル)のDMF溶液(1ml)にトリエチルアミン(0.2ミリモル)と塩化ジメチルホスフィノチオイル(Mpt-Cl)(0.1ミリモル)のDMF溶液(0.2ml)を室温下にて加えた。このものを5分後、調製例2で合成した修飾率25%のリジンメチルエステル結合コンドロイチン硫酸(50mg)の水-DMF(1:1, v/v)溶液(2ml)に氷冷下にて加えた。室温下にて1晩攪拌後、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回エタノール沈澱法により精製後、水(10ml)に溶解し脱イオン水にて2日間透析した。0.22ミクロンのフィルターで濾過後、凍結乾燥したところ標記化合物を白色粉末として5.8mg得た。270MHzのプロトンNMRの測定の結果、コンドロイチン硫酸のアセチル基由来のシグナルと( $\delta=2$  ppm)とデオキシコール酸の1方のメチル基由来のシグナル( $\delta=1.3-0.7$  ppm)の強度比(3:0.81)よりコンドロイチン硫酸の構成2糖単位あたりのデオキシコール酸の導入率は27%であった。

【0040】ここで、導入率は以下の式で表される。  
導入率(%) = 2糖単位当たりのデオキシコール酸の導入モル数  $\times 100$

#### 実施例2

アセチルサリチル酸修飾コンドロイチン硫酸の合成

調製例2で合成した修飾率25%のリジンメチルエステル結合コンドロイチン硫酸(50mg)を用い、実施例1のデオキシコール酸に代えてアセチルサリチル酸(アスピリン)を使用し同様の操作を行った。ただし混合酸無水物を作る際、アセチルサリチル酸、トリエチルアミン、Mpt-Clおよびそれらの溶媒は実施例1の5倍量を使用した。収量5.6mg。アスピリン(アセチルサリチル酸)の導入率は28%であった。

#### 【0041】実施例3

Z-アミノ酸を結合させたコンドロイチン硫酸の合成

Z-ロイシン(0.5ミリモル)のDMF溶液(2m

1) にトリエチルアミン (0.5 ミリモル) と Mpt-C1 (0.5 ミリモル) の DMF 溶液 (0.5 ml) を室温下にて加えた。このものを5分後、コンドロイチン硫酸のトリエチルアミン塩 (100 mg) と 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) (0.5 ミリモル) の DMF 溶液 (2 ml) に氷冷下にて加え、さらにトリエチルアミン (0.5 ミリモル) を加えた。室温下にて1晩攪拌後、5%炭酸水素ナトリウム溶液 (5 ml) を加え、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回エタノール沈澱法により精製後、水 (10 ml) に溶解し脱イオン水にて3日間透析した。0.22 ミクロンのフィルターで濾過後、凍結乾燥したところ標記化合物を白色粉末として107 mg 得た。270 MHz のプロトン NMR の測定の結果、コンドロイチン硫酸のアセチル基由来のシグナルと ( $\delta = 2$  ppm) と Z-ロイシンのベンゼン環由来のシグナルの強度比 (3:1.9) よりコンドロイチン硫酸の構成2糖単位あたりの Z-ロイシンの導入率は38%であった。

#### 【0042】実施例4

ヒアルロン酸の還元末端への保護アミノ酸の結合  
A) Fmoc-Ser (O<sup>t</sup>Bu)-OH (0.1 ミリモル) の DMF 溶液 (1 ml) にトリエチルアミン (0.1 ミリモル) と Mpt-C1 (0.1 ミリモル) の DMF 溶液 (0.1 ml) を氷冷下にて加えた。このものを5分後、還元末端に、常法による水素化シアノホウ素ナトリウムを用いた還元アミノ化法で1,6-ヘキサンジアミンを結合させた平均分子量4万のヒアルロン酸 (100 mg) の水-DMF (1:1) 溶液 (8 ml) に氷冷下にて加え、さらにトリエチルアミン (0.1 ミリモル) を加えた。室温下にて1晩攪拌後、5%炭酸水素ナトリウム溶液 (5 ml) を加え、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回エタノール沈澱法により精製後、水 (10 ml) に溶解し脱イオン水にて7日間透析した。0.22 ミクロンのフィルターで濾過後、凍結乾燥して白色粉末として106 mg 得た。270 MHz のプロトン NMR の測定の結果、ヒアルロン酸のアセチル基由来のシグナルと ( $\delta = 2$  ppm) と第3ブチル (t-Bu) 基由来のシグナルの強度比 (3:0.162) よりセリン1分子当たりのヒアルロン酸は2糖単位で56 ユニット結合していた。

【0043】B) コンドロイチン硫酸の還元末端への保護アミノ酸の結合

実施例4 A) のヒアルロン酸に代えて平均分子量3万のコンドロイチン硫酸を使用し同様の反応を実施したところ、1,6-ヘキサンジアミンが結合したコンドロイチン硫酸 (100 mg) より目的物を98 mg 得られた。NMRよりセリン1分子当たりのコンドロイチン硫酸は2糖単位で60 ユニット結合していた。

#### 【0044】実施例5

サラゾスルファピリジン修飾ヒアルロン酸の合成  
平均分子量4万のヒアルロン酸のナトリウム塩をイオン交換樹脂を用いた常法によりトリエチルアミン塩とした。このヒアルロン酸トリエチルアミン塩 (200 mg) の DMF 溶液 (15 ml) に DMAP (0.2 ミリモル) を加えたものに、実施例1と同様の方法で調製したサラゾスルファピリジン (0.2 ミリモル) の混合酸無水物を加え、室温下1晩攪拌した。実施例3と同様の後処理後、標記化合物を黄色粉末として117 mg 得た。NMRより求めたサラゾスルファピリジンの導入率は5%であった。

#### 【0045】実施例6

インドメタシン修飾コンドロイチン硫酸 (アミド結合で導入) の合成

インドメタシン (1 ミリモル) の DMF (2 ml) 溶液に氷冷下にて、トリエチルアミン (1 ミリモル) と Mpt-C1 (1 ミリモル) の DMF (2 ml) を加えた。このものを5分後、1,6-ヘキサンジアミンがスパーサーとして結合した平均分子量3万のコンドロイチン硫酸 (200 mg、調製例1と同様の方法で調製、導入率32%) の水-DMF (1:1) 溶液 (8 ml) に加え、続いてトリエチルアミン (1 ミリモル) を加えた。室温にて1晩攪拌後、実施例3と同様の処理したところ標記化合物を白色粉末として242 mg 得た。NMRより求めた導入率は24%であった。

#### 【0046】実施例7

インドメタシン修飾ヒアルロン酸 (エステル結合で導入) の合成

インドメタシン (1 ミリモル) の DMF 溶液 (1 ml) にトリエチルアミン (1 ミリモル) と Mpt-C1 (1 ミリモル) の DMF 溶液 (1 ml) を氷冷下にて加えた。このものを5分後、平均分子量80万のヒアルロン酸のトリエチルアミン塩 (100 mg) / DMF 溶液 50 ml と 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) (0.5 ミリモル) / DMF 溶液 (1 ml) の混合溶液に氷冷下にて加え、さらにトリエチルアミン (1 ミリモル) を加えた。室温下にて1晩攪拌後、5%炭酸水素ナトリウム溶液 (2 ml) を加え、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに5回80%エタノールにより洗浄、精製、減圧乾燥し標記化合物を白色粉末として140 mg 得た。

【0047】吸光光度法により予め算出した検量線より求めたインドメタシン含量とカルバズール硫酸法より求めたヒアルロン酸含量との比較より算出したインドメタシン導入率は、29.8%であった。

#### 実施例8

インドメタシン仕込み量と導入率の関係

50 実施例7記載の方法に従いインドメタシンの仕込み量



(反応当量)と導入率の関係を調べた。又、ヒアルロン酸も平均分子量を5万、30万、80万のものをを用いた。

【0048】結果を図1に記載した。図1を見ると仕込量と導入率の関係は、ほぼ一次の関係になっていることが分かる。又、ヒアルロン酸の平均分子量で見ると5万と30万はほぼ同様の挙動を示したが、80万のものについては全体的に反応性が低下していることが分かる。これは、高分子量による粘度の増加による影響であろうと考えられる。

#### 【0049】実施例9

t-ブトキシカルボニルグリシン修飾ヒアルロン酸の製造

平均分子量100万のヒアルロン酸ナトリウム80mg (2糖単位として0.2ミリモル)を20mlの水に溶解した後、ジオキサン10mlを加えた。この溶液にカルボキシル基をMpt-C1で混合酸無水物として活性化したt-ブトキシカルボニルグリシン175mg (1.0ミリモル)とトリエチルアミン139μl (1.0ミリモル)と4-ジメチルアミノピリジン122mg (1.0ミリモル)のジメチルホルムアミド溶液3mlを氷冷下にて加えた後、室温で1時間半撹拌を続けた。得られた溶液に150mlの酢酸ナトリウム飽和エタノールを注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回エタノール沈澱法により精製後、減圧乾燥することにより標記t-ブトキシカルボニルグリシン修飾ヒアルロン酸を白色粉末として75mg得た。NMRのヒアルロン酸アセチル基由来のシグナルと( $\delta=2$ ppm)と第3ブチル基由来のシグナル( $\delta=1.5$ ppm)の強度比より求めたt-ブトキシカルボニルグリシンのヒアルロン酸構成二糖単位当たりの導入率は11%であった。

#### 【0050】実施例10

ベンジルオキシカルボニルグリシン修飾ヒアルロン酸およびグリシン修飾ヒアルロン酸の製造

t-ブトキシカルボニルグリシンに代えてベンジルオキシカルボニルグリシン(Zグリシンとも記す)209mg (1.0ミリモル)を用い実施例7と同様の方法に従った。

【0051】精製後、減圧乾燥することにより標記ベンジルオキシカルボニルグリシン修飾ヒアルロン酸を白色粉末として74mg得た。NMRのヒアルロン酸アセチル基由来のシグナルと( $\delta=2$ ppm)とベンジルオキシカルボニルグリシンのベンジル基由来のシグナル( $\delta=7.5$ ppm)の強度比より求めたベンジルオキシカルボニルグリシンのヒアルロン酸構成二糖単位当たりの導入率は11%であった。

【0052】ベンジルオキシカルボニルグリシン修飾ヒアルロン酸60mg (0.15mmol/unit)を水50mlに溶解し、アルゴン雰囲気下で10%パラジ

ウム(Pd)活性炭15mg、蟻酸アンモニウム19mg (0.3mmol)を加え、室温で6時間撹拌した後、再び同量のPd活性炭、蟻酸アンモニウムを加え撹拌した。6時間後、再度同様の操作をした後、0.22μmのフィルターで活性炭を除去し、溶液を脱イオン水にて2日間透析した後、凍結乾燥により51mgの白色物を得た。NMRによりベンジル基由来のピーク( $\delta=7.5$ ppm)の消失を確認した。

#### 【0053】実施例11

10 t-ブトキシカルボニルグリシン修飾ヒアルロン酸(分子量15万)の製造

平均分子量15万のヒアルロン酸ナトリウム80mg (2糖単位として0.2ミリモル)を20mlの水に溶解した後、ジオキサン10mlを加えた。この溶液にt-ブトキシカルボニルグリシンのカルボキシル基をMpt-C1で混合酸無水物として活性化したt-ブトキシカルボニルグリシン175mg (1.0ミリモル)とトリエチルアミン139μl (1.0ミリモル)と4-ジメチルアミノピリジン122mg (1.0ミリモル)のジメチルホルムアミド溶液を氷冷下にて加えた後、室温で1時間半撹拌を続けた。得られた溶液に150mlの酢酸ナトリウム飽和エタノールを注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回エタノール沈澱法により精製後、減圧乾燥することにより標記t-ブトキシカルボニルグリシン修飾ヒアルロン酸を白色粉末として55mg得た。NMRより求めたt-ブトキシカルボニルグリシンのヒアルロン酸構成二糖単位当たりの導入率は5%であった。

#### 【0054】実施例12

30 A)コンドロイチン硫酸混合酸無水物及びベスタチン修飾コンドロイチン硫酸の合成

平均分子量3万のコンドロイチン硫酸のナトリウム塩をイオン交換樹脂を用いた常法によりトリエチルアミン塩とした。このコンドロイチン硫酸トリエチルアミン塩(50mg)のDMF溶液(2ml)に、氷冷下にてMpt-C1(0.1ミリモル)のDMF溶液(0.2ml)を加えコンドロイチン硫酸混合酸無水物を調製した。

【0055】5分後、ベスタチン(0.05ミリモル)とトリエチルアミン(0.05ミリモル)、さらに水(0.5ml)を加えて室温下1晩撹拌した。5%炭酸水素ナトリウム溶液(5ml)を加えた後、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回エタノール沈澱法により精製後、水(10ml)に溶解し脱イオン水にて4日間透析した。0.22ミクロンのフィルターで濾過後、凍結乾燥したところ標記化合物を白色粉末として57mg得た。270MHzのプロトンNMRの測定の結果、コンドロイチン硫酸アセチル基由来のシグナルと( $\delta=2$ ppm)とベスタチンのベンゼン環由来のシグナルの強

度比(3:0.41)よりコンドロイチン硫酸の2糖単位あたりのベスタチンの導入率は8%であった。

【0056】B) トラネキサム酸修飾コンドロイチン硫酸の合成

実施例10A)のベスタチンに換えてトラネキサム酸を使用し同様の操作を行ったところ、標記化合物を導入率15%で得た。

実施例13

フェニルアラニンベンジルエステル修飾コンドロイチン硫酸の合成

平均分子量3万のコンドロイチン硫酸のナトリウム塩をイオン交換樹脂を用いた常法によりトリエチルアミン塩としてDMFに溶解し、4Aのモレキュラーシーブを加えてこの溶液を乾燥した。このコンドロイチン硫酸トリエチルアミン塩(100mg)のDMF溶液(2ml)に、氷冷下にてMpt-C1(0.2ミリモル)のDMF溶液(0.4ml)を加えた。5分後、フェニルアラニンベンジルエステルのトシル塩(0.2ミリモル)とトリエチルアミン(0.4ミリモル)を加えて室温下1晩攪拌した。5%炭酸水素ナトリウム溶液(5ml)を加えた後、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回エタノール沈澱法により精製後、水(10ml)に溶解し、脱イオン水にて3日間透析した。0.22ミクロンのフィルターで濾過後、凍結乾燥したところ標記化合物を白色粉末として103mg得た。270MHzのプロトンNMRの測定の結果、コンドロイチン硫酸のアセチル基由来のシグナルと( $\delta=2$  ppm)とのフェニルアラニンベンジルエステルのベンゼン環由来のシグナルの強度比(3:2.5)よりコンドロイチン硫酸の2糖単位あたりのフェニルアラニンベンジルエステルの導入率は25%であった。

【0057】上記と同様の実験で、モレキュラーシーブによる該DMF溶液の乾燥を行わなかった場合、導入率は13%であった。

実施例14

アドリアマイシン修飾コンドロイチン硫酸の合成

平均分子量3万のコンドロイチン硫酸のナトリウム塩をイオン交換樹脂を用いた常法に従いテトラブチルアンモニウム塩とした。このコンドロイチン硫酸テトラブチルアンモニウム塩(50mg)のDMF(10ml)溶液に氷冷下にてMpt-C1(0.05ミリモル)のDMF(0.1ml)とトリエチルアミン(0.1ミリモル)を加えた。10分後アドリアマイシン(10mg)の水溶液(1ml)を加え、室温で1晩攪拌した。常法に従って処理したところ標記化合物を赤色粉末として50mg得た。NMRより求めた導入率は9%であった。

【0058】なお、公知のカルボジイミド法によってはコンドロイチン硫酸にアドリアマイシンを導入できなかった。

実施例15

メトトレキサート修飾ヒアルロン酸(エステル結合で導入)の合成

メトトレキサート(0.25ミリモル)のDMF溶液(1ml)にトリエチルアミン(0.25ミリモル)とMpt-C1(0.25ミリモル)のDMF溶液(1ml)を氷冷下にて加えた。このものを5分後、平均分子量80万のヒアルロン酸のトリエチルアミン塩(100mg)/DMF溶液50mlと4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(0.125ミリモル)/DMF溶液(1ml)の混合溶液に氷冷下にて加え、さらにトリエチルアミン(0.25ミリモル)を加えた。室温下にて1晩攪拌後、5%炭酸水素ナトリウム溶液(2ml)を加え、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回80%エタノールにより洗浄した。得られた沈澱を水に溶解した後、脱イオン水にて1晩透析し、凍結乾燥し標記化合物を白色粉末として77mg得た。

【0059】吸光度法により予め算出した検量線より求めたメトトレキサート含量とカルバゾール硫酸法より求めたヒアルロン酸含量との比較より算出したメトトレキサート導入率は、2.7%であった。

実施例16

ヒアルロン酸混合酸無水物及びメトトレキサート修飾ヒアルロン酸(アミド結合で導入)の合成

平均分子量80万のヒアルロン酸のナトリウム塩をイオン交換樹脂を用いた常法によりトリエチルアミン塩とした。このヒアルロン酸トリエチルアミン塩(100mg)のDMF溶液50mlに、氷冷下にてMpt-C1(0.25ミリモル)のDMF溶液(0.25ml)を加えヒアルロン酸混合酸無水物を調製した。

【0060】5分後、メトトレキサート(0.25ミリモル)のDMF溶液1mlとトリエチルアミン(0.25ミリモル)を加えて室温下1晩攪拌した。5%炭酸水素ナトリウム溶液(5ml)を加えた後、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回80%エタノールにより洗浄後、水(10ml)に溶解し脱イオン水にて3日間透析した。凍結乾燥したところ標記化合物を白色粉末として83mg得た。

【0061】吸光度法により予め算出した検量線より求めたメトトレキサート含量とカルバゾール硫酸法より求めたヒアルロン酸含量との比較より算出したメトトレキサート導入率は、3.0%であった。

実施例17

グルタミン修飾ヒアルロン酸(エステル結合で導入)の合成

Fmoc-Gln-OH(1ミリモル)のDMF溶液(1ml)にトリエチルアミン(1ミリモル)とMpt-C1(1ミリモル)のDMF溶液(1ml)を氷冷下にて加えた。

このものを5分後、平均分子量80万のヒアルロン酸のトリエチルアミン塩(100mg)/DMF溶液50mlと4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(0.5ミリモル)/DMF溶液(1ml)の混合溶液に氷冷下にて加え、さらにトリエチルアミン(1ミリモル)を加えた。室温下にて5時間攪拌後、5%炭酸水素ナトリウム溶液(2ml)を加え、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱をさらに3回80%エタノールにより洗浄後、水(10ml)に溶解し脱イオン水にて1日透析した。凍結乾燥したところFmoc-Gln-ヒアルロン酸を白色粉末として12.7mg得た。

【0062】吸光度法により予め算出した検量線より求めたFmoc-Gln-OH含量とカルバゾール硫酸法より求めたヒアルロン酸含量との比較より算出したグルタミン導入率は、31.3%であった。又、更にこのFmoc-Gln-ヒアルロン酸57mgに氷冷下、15%ジエチルアミン水溶液(20ml)を加え、室温にて1時間攪拌した。5%炭酸水素ナトリウム溶液(2ml)を加え、酢酸ナトリウム飽和エタノールに注ぎ、生じた沈澱を遠心分離した。得られた沈澱を80%エタノールにより洗浄後、水(10ml)に溶解し脱イオン水にて1日透析した。凍結乾燥したところ標記化合物を白色粉末として3.9mg得た。

#### 【0063】実施例18

コンドロイチン硫酸上でのペプチドの伸長

Fmoc-ロイシン(0.5ミリモル)を実施例3と同様の方法でMpt-C1と反応させ混合酸無水物とした。このものに調製例1で合成したヘキサンジアミン結合コンドロイチン硫酸(平均分子量3万、スパーサー導入率32%、100mg)の水-DMF(1:1)溶液(4ml)を滴下し、さらにトリエチルアミン(0.5ミリモル)を加えた。実施例3と同様に後処理したところFmoc-Leu-ヘキサンジアミン-コンドロイチン硫酸を白色粉末として9.9mg得た。270MHzの\*

\*プロトンNMRより求めたロイシンの導入率はコンドロイチン硫酸のカルボキシル基に対して18%(スパーサーに対して100%)であった。Fmoc-Leu-ヘキサンジアミン-コンドロイチン硫酸(95mg)に氷冷下、10%ジエチルアミン水溶液(5ml)を加え、1時間放置した。脱イオン水で2日間透析後、0.22ミクロンのフィルターで濾過、凍結乾燥したところ、Leu-ヘキサンジアミン-コンドロイチン硫酸を白色粉末として85mg得た。270MHzのプロトンNMRの測定の結果、ロイシン由来のシグナルは残り、Fmoc基由来のシグナルは消失していた。

【0064】以下同様に、Fmoc-フェニルアラニン、Fmoc-グリシン、Fmoc-グリシン、Fmoc-チロシンの結合とFmoc基の除去を繰り返し、最終的にロイシンエンケファリン修飾コンドロイチン硫酸を得た。

#### 【0065】

【発明の効果】以上説明したように、本発明はDDSや医療材料の素材として有望なGAG誘導体の新しい製造法として有用なものである。さらに本発明の製造法は、温和な条件のもとでの反応であるのでGAGの低分子化等の副反応が少ないこと、反応時間が短く、混合酸無水物が比較的安定であるので修飾率のコントロールが比較的容易である点で優れた方法である。更に含水有機溶媒中で反応させる(アシル化する)ことも出来る。

【0066】また、本発明の方法により製造されたインドメタシン、アドリアマイシン、サラゾスルファピリジン等の生理活性物質が結合したGAG誘導体は、水溶性、活性の持続性等の面で生理活性物質単独の場合に比べ優れた効果が期待される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例8におけるインドメタシンの仕込量と導入率の関係を示すグラフである。図中(mol/mol)は、インドメタシンのモル数/ヒアルロン酸(2糖)モル数を示す。

【図1】

